

Población rural en riesgo genético por exposición crónica y reciente a plaguicidas

Daniela M Ferré^{1,2}, Eliana Saldeña¹, Valeria Lentini¹, Rocío Carracedo¹, Valentina Hynes¹, Martín Quero¹, Marcelo Tornello¹, Nora B Gorla^{1,2}

¹Laboratorio de genética, Ambiente y Reproducción, Universidad Juan Agustín Maza, Acceso este, lateral Sur 2245, Mendoza, Argentina. ²CONICET. tel 02961-4056222. Email: noragorla@gmail.com.ar

Los efectos de la exposición durante largo periodo de tiempo, incluso años a bajas dosis de plaguicidas son siempre difíciles de evaluar, porque los signos y síntomas asociados pueden no tener manifestaciones clínicas. El monitoreo del efecto genotóxico de los plaguicidas en personas laboralmente expuestas es cada vez más utilizado para la identificación de daño y para la valoración de riesgo genético. Se tomaron muestras de epitelio bucal de 13 trabajadores rurales de Maipú, Mendoza, de $51,5 \pm 14,3$ años, relacionados con el uso de plaguicidas para estudiarlos a través del ensayo de MN Citoma. Todos han tenido exposición ocupacional continua y crónica a lo largo de 20 ± 4 años, seis de ellos sin exposición en los últimos 130 ± 36 días (grupo exposición no reciente: NoRec), y los siete restantes han además tenido un pico de exposición máxima en durante los últimos 30 días (grupo de exposición reciente: Rec). Todos han utilizado de 2 a 4 plaguicidas diferentes en el último año. Se obtuvo el consentimiento informado previo a la toma de muestra. Se analizaron 1000 células por persona. La frecuencia media \pm error estándar de células micronucleadas en los grupos NoRec y Rec respectivamente fueron; $10,43 \pm 4,06$ y $12,99 \pm 3,90$, células binucleadas $8,50 \pm 1,97$ y $5,71 \pm 0,74$, 1,67, brotes nucleares 0,61 y $1,29 \pm 0,52$. Los resultados del ANOVA fueron no significativos para éstas y las otras variables evaluadas: núcleos condensados, picnóticos, cariorréxicos y cariolíticos. Concluimos que: los indicadores de daño genético encontrados son biológicamente significativos respecto de los valores de referencia internacionales, y aparentemente los efectos de un pico de exposición reciente no se distinguen de un grupo expuesto laboralmente en forma crónica y continua a plaguicidas.

Palabras claves: plaguicidas- genotoxicidad- trabajadores rurales- ensayo micronúcleos citoma

Introducción

El departamento de Maipú tiene 717 km² de extensión territorial y está ubicado a 14km al este de la capital de Mendoza, posee 172.861 habitantes (2010, INDEC-Censo Nacional de Población) y una actividad agro-industrial importante ya que, exceptuando la vid y olivicultura, que son las actividades industriales que priman, es el tercer departamento de la provincia con mayor superficie cultivada con frutales, esto es el 8% (Fundación IDR, Fuente Frutihortícola Provincial 2011); donde se producen en cantidad decreciente: olivo, durazno, ciruelo, almendro, cerezo, damasco y con menor presencia peral, manzano, cítricos y membrillo (información obtenida de entrevistas propias, 2012). A partir de un relevamiento en 50 fincas de Maipú de 1 a 200 ha, sobre tipo y modos de uso de plaguicidas, se detectó que los 2 plaguicidas más utilizados son: en primer lugar (50% de los encuestados) el insecticida: **metidati6n** y en segundo lugar (30% de los encuestados) el herbicida **glifosato**. El metidati6n es un organofosforado que pertenece al grupo Ib (altamente peligroso) en la clasificaci6n toxicol6gica de la WHO (World Health Organization) (2010) y el glifosato es un fosfonato que pertenece al grupo III (levemente peligroso).

Metidati6n es un inhibidor de la acetil colinesterasa y puede ser usado como insecticida, nematocida y acaricida. Kevekorde y colaboradores (1996) han reportado un aumento significativo de genotoxicidad en el Intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos humanos incubados *in vitro* con metidati6n y con activaci6n metab6lica.

El glifosato, en nuestro paí6s, y en gran parte del planeta es el plaguicida del que mäs volúmenes se vierten al ambiente. A pesar de una reglamentaci6n inicial de la EPA (Environmental Protection Agency) y de la WHO donde el glifosato fue inicialmente clasificado como “relativamente no t6xico” en base a su Dosis Letal 50 (WHO; 1994), muchas investigaciones recientes, cuestionan su inocuidad (Bolognesi et al, 1997; Lioi et al., 1998; Dallegrave et al. 2002; Mañas et al., 2006, 2009 a y b, en prensa). Mañas (2012) expone que el aumento en el daño genético por glifosato ha sido encontrado por muchos investigadores en distintos laboratorios alrededor del mundo en los últimos diez ańos, los que han observado mayores niveles de daño genético en cultivos celulares y animales de experimentaci6n expuestos tanto a glifosato como a su principal metabolito AMPA (ácido aminometilfosf6nico). No existen ensayos semejantes como biomarcador de efecto en personas expuestas a estos compuestos, con cuantificaci6n concomitante de los mismos en sangre como biomarcador de exposici6n. En el presente trabajo,

evaluamos genotoxicidad en células exfoliadas de trabajadores rurales que señalan a metildatión y glifosato como los plaguicidas que más aplican.

El monitoreo del efecto genotóxico de los plaguicidas en personas laboralmente expuestas es cada vez más utilizado para la identificación de daño y para la valoración de riesgo genético ya que los efectos de la exposición durante largo periodo de tiempo, a bajas dosis de plaguicidas es siempre difícil de evaluar, porque los signos y síntomas asociados pueden no tener manifestaciones clínicas. Si bien los ensayos de MN, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas en sangre periférica son los biomarcadores de daño genético más utilizados en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas (Aiassa et al., 2012), el estudio del daño al ADN mediante el ensayo de micronúcleos citoma en células bucales exfoliadas es un método mínimamente invasivo, por lo cual es ideal para efectuar un “screening” en poblaciones de riesgo. Este método permite detectar los efectos de la exposición a agentes genotóxicos, a través de la presencia de micronúcleos (MN) y otras anomalías nucleares, a las que se las ha asociado con defectos genéticos en el mantenimiento del genoma, envejecimiento acelerado, daño genotóxico, y algunas enfermedades degenerativas (Holland et al., 2008, Thomas et al., 2009, Ceppi et al., 2010).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el nivel de daño genético en un grupo de trabajadores rurales con exposición laboral crónica a plaguicidas, la mitad de ellos en periodo de descanso de aplicación y los restantes con exposición durante el mes previo a la toma de muestras,

Materiales y métodos

Se tomaron muestras de epitelio bucal de 13 trabajadores rurales de Maipú, Mendoza, relacionados con el uso de plaguicidas. Todos ellos con exposición ocupacional continua y crónica a los largo de 20 ± 4 años. Seis de ellos sin exposición en los últimos 90 ± 10 días (grupo exposición no reciente: No Rec). Los restantes seis además habían tenido un pico de exposición máxima en el último mes, (grupo de exposición reciente: Rec). Todos habían utilizado de 2 a 4 plaguicidas diferentes en el último año; y relataron haber trabajado mezclando y aplicando los plaguicidas Se analizaron 950-2000 células por persona.

Desde la planificación de la investigación se tuvieron en cuenta aspectos estrictamente necesarios y recomendados para el biomonitoreo de personas expuestas, permiso ético, manejo concurrente e idéntico de las muestras de ambos grupos, las muestras fueron

codificadas al ingresar al laboratorio, Y el análisis de las muestras fue realizado con desconocimiento por parte del operador del grupo NRec o Rec al que correspondían las mismas.

Las células bucales se originan a partir de las múltiples capas del epitelio que recubre la cavidad oral. Antes de la recolección de células bucales se enjuagó la boca con agua, para eliminar residuos no deseados. Con pequeñas espátulas de plástico se rozó ambos lados internos de la mejilla, e inmediatamente después se realizó un extendido sobre portaobjetos limpios. Los portaobjetos fueron secados al aire y después fijados en metanol: ácido acético (3:1) durante un tiempo mínimo de 10 minutos. Posteriormente se dejaron secar al aire antes de la tinción con Giemsa al 10% durante 10 minutos.

Al análisis microscópico se distinguieron las células basales de las células diferenciadas y se analizaron las siguientes anomalías nucleares encontradas en el ensayo de micronúcleos citoma bucal: Células con micronúcleos, células con brotes nucleares, binucleadas, con cromatina condensada, cariorréxicas, picnóticas y kariolíticas. Estos tipos celulares se determinaron sobre la base de los criterios descritos por Thomas et al, 2008. Las células con Micronúcleos se caracterizan por la presencia tanto de un núcleo principal y uno o más núcleos más pequeños, llamados micronúcleos. Los micronúcleos suelen ser redondos o de forma oval y su diámetro puede variar entre $1/3$ y $1/16$ del diámetro del núcleo principal. Las células con micronúcleos suelen contener sólo un micronúcleo. Es posible, pero raro, encontrar células con más de seis micronúcleos. Las células con brotes nucleares tienen núcleos con una constricción aguda evidente en un extremo del núcleo que sugiere un proceso de gemación, es decir, la eliminación de material nuclear por gemación. El brote nuclear y el núcleo están generalmente muy cercanos y aparentemente unidos entre sí. El brote nuclear tiene la misma morfología y propiedades de tinción que el núcleo, sin embargo, su diámetro puede variar de $1/2$ a $1/4$ del diámetro del núcleo principal. Las células binucleadas tienen dos núcleos en lugar de uno. Por lo general están muy cerca uno del otro, incluso pueden tocarse. Las células con cromatina condensada tienen núcleos con regiones de cromatina condensada o agregados que exhiben un patrón nuclear moteado o estriado. En estas células es evidente la agregación que la cromatina en algunas regiones del núcleo, mientras que se pierde en otras áreas. Cuando la condensación de la cromatina es intensa, el núcleo puede parecer que está fragmentando. Se considera que estas células tal vez estén sufriendo las primeras etapas de la apoptosis. Las células cariorréxicas se caracterizan por la aparición de cromatina nuclear más condensada (en relación con las células antes

descriptas) que conduce a la fragmentación y la desintegración final del núcleo. Las células picnóticas se caracterizan por un pequeño núcleo encogido, con una alta densidad de material nuclear que es uniforme e intensamente teñido. El diámetro nuclear es generalmente de 1/3 a 2/3 de un núcleo tipo en las células diferenciadas normales. Por último las células cariolíticas tienen el núcleo completamente exento de ADN y aparece como una imagen “fantasma” sin núcleo.

Resultados

En la Figura 1 se presentan algunas de las alteraciones nucleares observadas con mayor frecuencia en las personas estudiadas en el presente trabajo, células micronucleadas, células con brotes nucleares y células binucleadas. En la tabla 1 se presentan la media±error estándar de cada tipo de alteraciones nucleares observadas. Cada 1000 células analizadas las alteraciones nucleares observadas en el grupo No Rec y Rec respectivamente varían desde 1,4 a 28,1 y desde 1,2 a 30,0 células con MN; desde 0,0 a 3,0 y 1,0 a 4,0 células con brotes nucleares, desde 1,0 a 16 y 2,0 a 8,0 células binucleadas, desde 6,0 a 37,0 y 5,0 a 39,0 células con cromatina condensada, desde 3,0 a 42,0 y 0,0 a 28,0 células con núcleos picnóticos, desde 0,0 a 119 y 0,0 a 22,0 células cariorréxicas y desde 0,0 a 102,0 y 1,0 a 42,0 células cariolíticas.

Los resultados del ANOVA fueron no significativos para los dos grupos estudiados y para estas variables evaluadas.

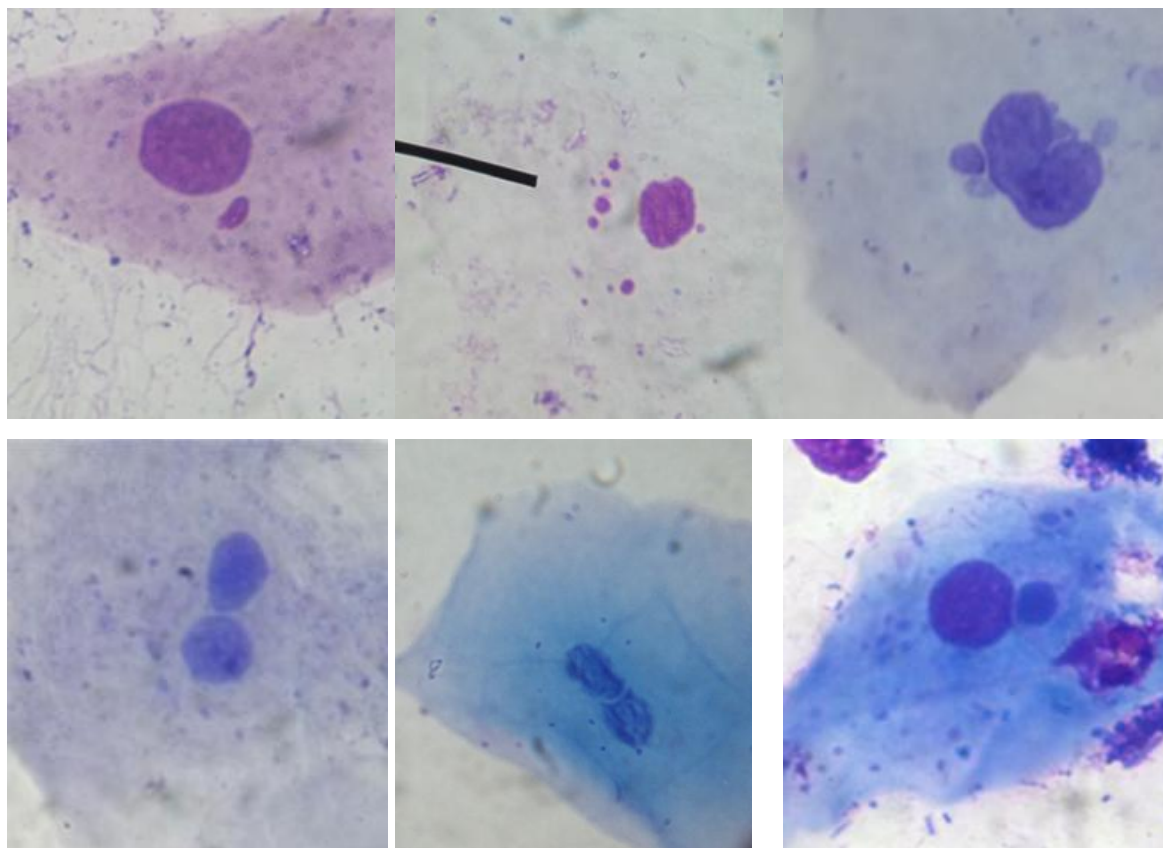


Figura 1: Alteraciones nucleares observadas en células de la mucosa bucal de trabajadores rurales de Maipú, Mendoza. A -B: Células micronucleadas, C: Núcleo lobulado y con yema, D-E: Células binucleadas, E- F: Núcleo con brote o yema.

Alteraciones nucleares en 1000 células analizadas	Grupo con exposición crónica y sin exposición reciente a plaguicidas (n= 6)	Grupo con exposición crónica y reciente a plaguicidas (n= 7)
Células basales	20,5±3,0	17,0±6,3
Células micronucleadas	10,4 ±4,1	12,9 ± 3,9
Núcleos con brotes	1,7 ± 0,6	1,3 ± 0,5
Células binucleadas	8,5 ± 1,9	5,7 ± 0,7
Núcleos condensados	17,2±4,7	15,4±5,1
Células cariorrexicas	25,0±19,0	19,8±9,8
Células kariolíticas	22,0±16,3	19,1±6,8

Tabla 1: Características del ensayo de Micronúcleos Citoma en mucosa bucal de 13 trabajadores rurales de Maipú, Mendoza. Los resultados se presentan como media ± error estándar de la media.

Discusión

En este trabajo se estudiaron células de trabajadores rurales que llevan aproximadamente dos decenios usando plaguicidas, por lo tanto los consideramos de exposición crónica y continua a los mismos. En general son personas que realizan todas las tareas de la finca, por lo tanto preparan las mezclas de plaguicidas, llenan los equipos y los aplican personalmente, ya sea con tractor que arrastra los tanques de plaguicida y una pulverizadora o un equipo de goteo, o caminando con mochila y flecha. La media de cada alteración nuclear en el grupo sin exposición reciente no difiere significativamente del grupo con exposición reciente o en pico de exposición. Esto nos conduce a una primera conclusión, que los valores de genotoxicidad encontrados pueden ser el producto de una exposición continua y crónica, común a todas las personas estudiadas. Durante una larga exposición crónica, se presume que la inducción y reparación del ADN dañado está en estado de equilibrio (Albertini et al, 2000) y la frecuencia de daño cromosómico depende del nivel, frecuencia y duración de la exposición y del mecanismo clastogénico. El mejor momento para detectar daño genético es cuando ha terminado la exposición crónica o dentro de las pocas horas a días después de una exposición aguda. Se ha determinado que este tiempo es no más de

2 días para el caso de linfocitos en sangre (Albertini et al., 2000) y hemos consideramos no más de un mes en el caso de células epiteliales de la mucosa bucal, dado que entre 7 a 21 días es el tiempo que tardan las células basales en alcanzar las capas superficiales (Ceppi et al., 2010). Medir genotoxicidad en picos de exposición al genotóxico posibilita estudiar a las personas en el periodo de sobrecarga de los mecanismos de defensa hacia los efectos adversos, mecanismos que si son sobrepasados pueden conducir a efectos genotóxicos y a mayores consecuencias para la salud. Las muestras tomadas inmediatamente después de la exposición aumentarían la chance de detectar el daño (Albertini et al., 2000). En nuestra investigación no encontramos diferencias biológica ni estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados. El nivel de daño cromosómico es alto si la comparamos con datos de la bibliografía. La frecuencia media espontanea de MN en 5424 sujetos saludables, a los que no se les conoce la exposición a compuestos genotóxicos o radiaciones, (30 bases de datos de laboratorios de 16 países), mostró una media de 0,74 o/oo con una variación ente 0,32 y 1,70; la frecuencia media espontanea de yemas nucleares fue 1,39 o/oo en alrededor de 800 sujetos controles saludables, 3,04 o/oo de células binucleadas y 2,23 o/oo células cariorréxicas (Bonassi et al, 2011). La teoría indica que el nivel de daño al ADN disminuye en el tiempo por reparación de ADN, por apoptosis, necrosis y-o recambio celular. En nuestro caso el grupo con 90 días de descanso no evidenció ese efecto, es decir que el nivel de daño observado sería un reflejo de la exposición crónica, común a ambos grupos; y además la exposición reciente no acrecentó ese nivel de daño.

Si comparamos los resultados obtenidos con investigaciones semejantes a la presente, que utilizan el mismo ensayo, en trabajadores de España, Polonia, Grecia y Hungría, los autores no indicaron ningún aumento son respecto al grupo referente en la frecuencia de MN en células bucales relacionadas a la exposición a plaguicidas (Pastor et al., 2013). Paralelamente otros estudios si obtienen diferencias biológicamente significativas entre grupos expuestos y grupos de referencia, En México dos estudios diferentes, en floricultores de viveros (Gómez Arroyo et al., 2000) y en el mismo año un estudio en el estado de Sinaloe en trabajadores agrícolas que usan principalmente organofosforados y carbamatos, reportaron un claro aumento en la frecuencia de MN sin correlación con tiempo de exposición (Martínez Valenzuela et al., 2009), semejante a nuestro análisis de tiempos de exposición crónica y no reciente versus exposición crónica y reciente.

Más recientemente, en Brasil, aumentos significativos en la frecuencias de MN fueron observadas en trabajadores involucrados en el cultivo de soja en el estado de Rio

Grande do Sul (Brasil) (Bortoli et al., 2009), y en otros trabajadores de granja del mismo estado (Remor et al, 2009); otro grupo de investigadores encontró aumentos en el nivel de MN ($3,3 \pm 2,4$) y de yemas nucleares ($5,9 \pm 5,1$) (Benedetti et al, 2013).

En Argentina, los estudios más semejantes son los de Gentile et al., 2012, quienes efectuaron el ensayo de MN en cultivos de sangre periférica (CBMN) como biomarcador de genotoxicidad en la exposición ocupacional a agroquímicos en trabajadores rurales de la provincia de Córdoba y observaron una duplicación en el nivel de MN. En la misma provincia, Mañas et al., 2009 implementaron el ensayo de aberraciones cromosómicas AC, en un grupo humano análogo al anterior y mostraron el factor de riesgo que representa la exposición a plaguicidas para la salud humana en el grupo estudiado, en comparación con el grupo de referencia. En las diferencias que se observan entre diferentes autores de no efecto sobre el material genético versus daño al material genético sería muy importante considerar siempre los elementos de protección personal que se utilizan, información generalmente ausente en los estudios de genotoxicidad. , pero posiblemente influyente en los resultados.

¿Qué significan las alteraciones observadas? La frecuencia de células con micronúcleos y brotes nucleares provee una medida de daño genómico y/o inestabilidad cromosómica. Un aumento de células micronucleadas es un biomarcador de efecto genotóxico que refleja exposición a un agente clastogénico, o a un agente aneugénico (aneuploidogénico) que en general no tiene el ADN como blanco. Los MN formados por fragmentos cromosómicos resultan de: daño cromosómico directo, replicación de un ADN dañado, inhibición de la síntesis de ADN, fallas en el huso mitótico, quinetocoro u otra parte del aparato mitótico, daño en subestructuras cromosómicas, alteraciones en la fisiología celular, disrupción mecánica (Albertini et al., 2000). El mecanismo que conduce a esta alteración morfológica puede ser debido a la eliminación de ADN amplificado o de complejos de reparación del ADN. Los dos núcleos pueden ser indicativos de una citocinesis fallida después de la última división nuclear.

Las células picnóticas, cariorréxica y cariolíticas se considera que están en proceso de algún tipo de muerte celular, siendo las cariolíticas las que representarían una fase muy avanzada pero esto no se ha demostrado de manera concluyente (Thomas et al., 2008).

Las células bucales que se utilizan en este Bioensayo tienen un atractivo interesante frente a otras células habitualmente utilizadas como podría ser las células sanguíneas, y es que son la primera barrera en la ruta de inhalación o ingestión de alimentos y también de xenobióticos, y tienen la capacidad de metabolizar pro-carcinógenos a productos

reactivos. Además, dado que aproximadamente el 90% de los cánceres humanos se originan en células epiteliales, utilizar células de este tipo les da un protagonismo muy diferente frente a los tradicionalmente usados linfocitos de sangre periférica (Holland et al., 2008, Thomas et al., 2009, Ceppi et al., 2010). Las células bucales han mostrado capacidad relativa limitada en relación a los linfocitos de sangre periférica para reparar daño al ADN (Dhillon et al., 2004), y puede ser una de las razones por las que el nivel de daño es alto. Los tipos celulares que son menos eficientes en la reparación del ADN deberían mostrar niveles mayores de daño residual respecto de las células que son más eficientes para la reparación de ADN (Visvardis et al., Singh et al., 1990).

Los niveles de alteraciones nucleares son altos respecto de los valores de referencia internacionales, sin embargo, todas las exposiciones laborales estudiadas han estado asociadas con un aumento significativo de MN en células bucales exfoliadas cuando se lo compara con el grupo control (Bonassi et al., 2011). Desde 1980 se viene demostrando que los efectos citogenéticos de la exposición ambiental y ocupacional, de los estilos de vida, deficiencias dietarias, y diferentes enfermedades deben ser tenidos en cuenta por sus efectos sobre el material genético.

Los trabajadores estudiados desde el punto de vista de la genotoxicidad por su exposición laboral a plaguicidas están expuestos principalmente a metidación y a glifosato, cuyas clasificaciones de toxicidad según la WHO expusimos con anterioridad. Sin embargo adherimos a la postura de algunos autores sobre el hecho de que se debería dejar de condicionar a la demostración científica sobre la inocuidad de estas sustancias basada en los criterios de peligrosidad recomendados por la WHO, la cual se funda en la toxicidad aguda del plaguicida, evaluada través de la Dosis Letal 50 (DL50), que no es indicativo de la toxicidad crónica, que puede surgir de pequeñas exposiciones diarias al plaguicida a través de un largo período, incluso años, con efectos graves para la salud (Kaczewer, 2010).

Los indicadores de daño genético encontrados son biológicamente significativos, y aparentemente los efectos de un pico de exposición reciente a plaguicidas no se distinguen de un grupo expuesto laboralmente en forma crónica y continua a plaguicidas.

Bibliografía

Aiassa F, F. Mañas, Bosch B, Gentile N, Bernardi N, Gorla N, 2012, Biomarcadores de daño genético en poblaciones humanas expuestas a plaguicidas, *Acta Biol. Colomb.*, 17, 485–510..

Albertini, R, D Anderson, G Douglas, L Hagmar, K Hemminki, F Merlo, A Natarajan, H Norppa, D Shuker, R Tice, M Waters y A Aitio. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutation Research* 463: 111–172.

Benedetti D, E Nunes, M Sarmiento, C Porto, C Eliete lochims dos Santos, J Ferraz Dias, J da Silva, 2013, Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays, *Mutation Research*, 752, 28–33.

Bolognesi, C., S. Bonatti, E. Gallerani, M. Peluso, R. Rabboni, P. Roggeri y A. Abbondandolo. 1997. Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup J.Agric. Food Chem. 1997. 45: 1957-1962.

Bonassi S., B. Biasotti, M. Kirsch-Volders, S. nasmueller, E. Zeiger, S. Burgaz, et al., 2009, HUMNXL Project Consortium; State of the art survey of the buccal micronucleus assay—a first stage in the HUMNXL project initiative, *Mutagenesis* 24, 295–302.

Bonassi S., E Coskun, M Ceppi, C Lando, C Bolognesi, S Burgaz et al., 2011, The HUman MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol, *Mutation Research* 728, 88–97.

Bortoli, G. M., Azevedo, M. B. and Silva, L. B., 2009, Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutat. Res.*, 675, 1–4

Ceppi M, Biasotti B, Fenech M, Bonassi S. 2010, Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues. *Mutat Res.*; 705:11–9.

Dallegrave, E., F. DiGiorgio Mantese, R. Soares Coelho, J. Drawans Pereira, P. Dalsenter y A. Langeloh. 2002. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. *Tox. Let.* 142: 45–52.

Dhillon V.S., P. Thomas, M. Fenech, 2004, Comparison of DNA damage and repair following radiation challenge in buccal cells and lymphocytes using single-cell gel electrophoresis, *Int. J. Radiat. Biol.* 80, 517–528.

EPA (Environmental Protection Agency). 1993. Re-registration Eligibility Decision (RED): Glyphosate. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC. [En línea]. Disponible en: <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/0178fact.pdf>>

Fenech M, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmuller, N.Holland, 2007, Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells—a human micronucleus (HUMN) project (www.humn.org) initiative commencing in, *Mutagenesis* 22, 3–4.

Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W. P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M., and Bonassi, S., 2011, The HUMN and HUMNXL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells- past, present and future, *Mutagenesis* 26, 239–245.

Gentile, N., F. Mañas, B. Bosch, L. Peralta, N. Gorla y D. Aiassa. 2012. Micronucleus assay as a biomarker of genotoxicity in the occupational exposure to agrochemicals in rural workers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 816–822.

Gomez-Arroyo, S., Diaz-Sanchez, Y., Meneses-Perez, M.A., Villalobos Pietrini, R. y De Leon-Rodriguez, J. (2000) Cytogenetic biomonitoring in a Mexican foriculture worker group exposed to pesticides. *Mutat. Res.*, 466, 117–124.

Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S. and Fenech, M. (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.*, 659, 93–108.

Kaczewer J 2010, Uso de Agroquímicos en las Fumigaciones Periurbanas y su Efecto Nocivo sobre la Salud Humana, http://www.rap-al.org/index.php?seccion=8&f=news_view.php&id=343

Kevekorde S, T Gebel, K Pavb, R Edenharderb, H Dunkelberg, 1996, Genotoxicity of selected pesticides in the mouse bone-marrow micronucleus test and in the sister-chromatid exchange test with human lymphocytes in vitro, *Toxicology Letters* 89, 35–42.

Lioi, M., M. Scarfi, A. Santoro, R. Barbieri, O. Zeni, F. Salvemini, D. Di Berardino y M. Ursini. 1998. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. *Environ Mol Mut.* 32: 39 – 46.

Lucero L, S Pastor, S Suarez, R Durban R, C Gómez, T Parrón, A Creus y R Marcos. 2000. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research* 464: 255-262.

Mañas F, ¿Qué sabemos sobre los efectos biológicos del plaguicida más empleado en nuestro país? El herbicida glifosato bajo la lupa. En: Aiassa D, Bosch B, Mañas f (comp.), 2012, Plaguicidas a la carta: daño genético y otros riesgos. pp 212. Editorial Trespidi, Río Cuarto.

Mañas, F., H. García Ovando, L. Peralta, I. Larripa, M. Gonzalez Cid, L. Ugnia, A. Weyers, J. Raviolo y N. Gorla. 2009a. Genotoxicity of ampa, environmental metabolite of glyphosate, assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72: 834–837.

Mañas F, Peralta L, Gorla N, Bosh B, Aiassa D, 2009, Aberraciones cromosómicas en trabajadores rurales de la Provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas. *Journal of basic and applied genetics*, 20: 9–13.

Mañas Torres, F., M. González Cid Urroz, H. García Ovando, L. Weyers Anchordoqui, L. Ugnia Vera, I. Larripa Hand y N. Gorla Abrate. 2006. La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. *Theoria*, 15: 53–60.

Mañas, F., L. Peralta, H. García Ovando, A. Weyers, L. Ugnia, I. Larripa, M. González Cid y N. Gorla. 2009b. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28: 37–41.

Mañas, F., L. Peralta, L. Ugnia, A. Weyers, H. García Ovando, N. Gorla, (en prensa) Oxidative stress and comet assay in tissues of mice administered glyphosate and AMPA in drinking water for 14 days, *Journal of Basic and Applied Genetics*.

Martínez-Valenzuela, C., Gómez-Arroyo, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Calderon-Segura, M. E., Felix-Gastelum, R. and Alvarez-Torres, A., 2009, Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environ. Int.*, 35, 1155–1159.

Pastor S, A Creus, T Parron, A Cebulski-Wasilewska, C Siffel, S Piperakis, R Marcos, 2003, Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers, *Mutagenesis* 18, 249–258.

Remor, A. P., Totti, A. C., Moreira, D. A., Dutra, G. P., Heuser, V. D. and Boeira, J. M. (2009) Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ. Int.*, 35, 273–278

Singh N.P., D.B. Danner, R.R. Tice, L. Brant, E.L. Schneider, 1990, DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes, *Mutat. Res.* 237, 123–130.

Thomas P, S. Harvey, Gruner Ti, Fenech M, 2008, The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls, *Mutation Research* 638, 37–47.

Visvardis E.E., A.M. Tassiou, S.M. Piperakis, 1997, Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and gamma-irradiation with the alkaline comet assay, *Mutat. Res.* 383, 71–80.

WHO (World Health Organisation). 1994. Glyphosate. *Environmental Health Criteria* 159. The Internal Programme on Chemical Safety (IPCS), WHO, Geneva. 159: 84–86.

WHO (World health Organization), 2010. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification, Ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Alemania, .pp.78.